

Aus der Medizinischen Klinik (Vorstand: Prof. Dr. Stefan Rusznyák)
der Kgl. Ungarischen Franz Joseph-Universität zu Szeged.

Versuche zur Bestimmung der Röntgenresistenz des Virus der übertragbaren Hühnerleukose.

Von

Erich Forfota.

In einer früheren Mitteilung berichteten wir über röntgentherapeutische Versuche an erythroleukämischen Hühnern. Es handelte sich um Versuche in vivo an Tieren, welche wir mit dem übertragbaren Leukosestamm von Jármai (Erythroleukose nach Ellermann) infizierten und an welchen wir die Wirkung von kleinen bzw. mittleren Strahlendosen, wie sie den in der Röntgentherapie der menschlichen Leukämie gebräuchlichen Dosen entsprechen, auf die Entwicklung des leukämischen Blutbildes, auf den Verlauf der Krankheit und auf die Virulenz bzw. Strahlenresistenz des Agens beobachteten. Wir kamen zu dem Ergebnis, daß die angewandten Strahlenmengen zu Beginn der Erkrankung die Überschwemmung des Blutes mit Leukosezellen vorübergehend zu hemmen, nicht aber zu verhindern vermochten, in späterem Stadium der Krankheit aber, bei vollentwickeltem leukämischen Blutbild, fast ohne Wirkung waren. In keinem Fall vermochte die Behandlung die erkrankten Tiere zu heilen oder auch nur den Ablauf der Krankheit zu verzögern, auch konnten wir bei der Weiterimpfung des von strahlenbehandelten kranken Tieren stammenden Infektionsmaterials 5 Generationen hindurch, trotz der in jeder neuen Generation erneuten Röntgenbehandlung, keine Schwächung der Infektionskraft und Virulenz des Agens beobachten. Es stimmen diese Ergebnisse im allgemeinen mit den Erfahrungen von Jármai, Engelbreth-Holm und Rothe-Meyer, Hirschfeld und Jacoby überein, stehen aber bezüglich der beobachteten Resistenz des Virus Röntgenstrahlen gegenüber in einem gewissen Gegensatz zu Jármai, Engelbreth-Holm und Rothe-Meyer, die auf Grund ihrer allerdings sehr spärlichen Versuche zu der Ansicht kamen, daß die Röntgenbehandlung kranker Tiere die Virulenz des Virus abzuschwächen imstande sei. Jármai und Mitarbeiter fanden von 4 Versuchen in einem Fall, daß das Organmaterial des behandelten Tieres nach der

Röntgenbestrahlung seine Pathogenität verlor, und sind deshalb der Ansicht, daß entsprechende Dosen vielleicht selbst das Agens abtöten können. In den Versuchen von Engelbreth-Holm und Rothe-Meyer verlor das Blut eines Huhnes nach der Bestrahlung seine Infektionskraft, das des anderen Tieres jedoch blieb pathogen, obwohl dieses Tier die Bestrahlung um 14 Tage überlebte. Nach Ansicht dieser Autoren spricht die verzögerte Krankheitsdauer in diesem Fall vielleicht für eine Schwächung der Virulenz des Agens infolge der Röntgenbehandlung. Leider fehlen uns Angaben darüber, wie groß die Strahlenmengen waren, welche die genannten Autoren verwendeten. Um über die Röntgenresistenz des Leukoseagens Genaueres zu erfahren, schienen uns weitere Beobachtungen erwünscht. Wir bedienten uns zu diesem Zweck Versuchen *in vitro*; diese erwiesen sich geeigneter als die Bestrahlung kranker Tiere, weil hier die Verhältnisse klarer zutage treten. Es handelt sich notwendigerweise nämlich um so große Strahlenmengen, welche bei Versuchen *in vivo* die Tiere an sich schon schwer geschädigt hätten.

Über Versuche *in vitro* haben ebenfalls Jármai sowie Engelbreth-Holm und Rothe-Meyer berichtet. Ersterer untersuchte die Wirkung von UV-Strahlen auf Organextrakt, konnte aber nach einstündiger Einwirkung von 15 cm Abstand keine Schädigung verzeichnen. In den Versuchen von Engelbreth-Holm und Rothe-Meyer konnte die Virulenz bestrahlten Blutes *in vitro* durch eine Röntgendosis von 10 HED nicht vernichtet werden, woraus die Autoren darauf schließen, daß sich das erythroleukotische Agens Röntgenstrahlen gegenüber vielleicht dem Rous-Agens ähnlich verhält, welches erst durch Dosen von 75 HED vernichtet wird (Angabe von Engelbreth-Holm und Rothe-Meyer, zitiert nach Jármai). Eine genauere Untersuchung dieser Frage schien uns auch deshalb erwünscht, weil die Resistenzbestimmung des Erregers Röntgenstrahlen gegenüber zu interessanten Folgerungen über seine Natur und Eigenschaften führen konnte.

Zu den Versuchen benutzten wir 52 Markthühner ohne besondere Auswahl. Es dienten uns 16 Tiere zur Kontrolle bzw. zur Erhaltung des unbeeinflussten Leukoseagens, die übrigen Tiere zu den eigentlichen Versuchen. Die Tiere wurden durch intravenöse Injektion mit einer aus der Leber eines an Erythroleukose eingegangenen Tieres gewonnenen Organemulsion in physiologischer Kochsalzlösung in die Achselvene infiziert. Es wurde das Blutbild der Tiere fortlaufend kontrolliert und nach erfolgtem Tode die Diagnose auch autoptisch gesichert. Die Bestrahlungsversuche unternahmen wir in 4 Reihen. Jede Reihe erhielt 3 Kontrolltiere, welche mit frischem, unbestrahltem Infektionsstoff, und

je 2 Gruppen von 3 Tieren, welche mit vorbestrahltem Material infiziert wurden. Sowohl für die Kontrollen als auch für die Versuchstiere verwendeten wir in jeder Reihe immer nur den gleichen, von einem einzigen leukämischen Tier stammenden Infektionsstoff. Falls die mit vorbestrahltem Agens infizierten Tiere an Leukose eingingen, verfolgten wir die Infektionskraft und Virulenz des bestrahlten Agens auch in der zweiten Generation, indem wir nun von den mit vorbestrahltem Agens infizierten und dennoch an Leukose eingegangenen Tieren in jeder Gruppe auf je zwei neue Tiere weiterimpften. Die einzelnen Reihen bestanden also insgesamt aus 13 Tieren.

Bestrahlt wurde das Agens in der frisch entnommenen Leber. Ein Teil der Leber diente unbestrahlt zur Infektion der Kontrollen, je zwei Organstückchen von 1 cm Dicke wurden der Wirkung der Röntgenstrahlen ausgesetzt. Nach beendigter Exposition wurde aus den drei verschieden behandelten Organteilen die Emulsion wie üblich, jedoch gesondert hergestellt und alle 3 Gruppen derselben Reihe immer zu gleicher Zeit infiziert. Die Bestrahlungsbedingungen bleiben in allen Versuchen die gleichen, indem wir mit einer Metwaröhre mit Wasserkühlung, ohne Filter, aus 20 cm Fokus-Abstand, mit 150 kV_{eff} Röhrenspannung und 4 mA Stromstärke arbeiteten. Die Dosis von 1 HED, zu 550 r berechnet, wurde unter diesen Umständen in 1,8 Minuten erreicht (Hammerdosimeter). Wir untersuchten auf diese Weise in der ersten Versuchsreihe die Wirkung von 10 bzw. 20 HED, in der zweiten Reihe von 40 und 80 HED, in der dritten Reihe von 100 und 120 HED und in der vierten Versuchsreihe die Wirkung von 150 und 200 HED. Die Expositionszeit für letztere enorme Strahlendosis betrug 6 Stunden.

Die Wirkung der Röntgenstrahlen auf das Virus der übertragbaren Hühnerleukämie blieb in allen Versuchsreihen die gleiche, nämlich null! Selbst die enorme Strahlenmenge von 200 HED oder 110 000 r blieb ohne jeden Erfolg, indem wir durchweg in allen Versuchen irgendwelche Schwächung der Infektionskraft und Virulenz des Erregers nicht beobachten konnten. Alle Tiere starben an erythroblastotischer Leukose; die Anschlagskraft des Virus, die Krankheitsdauer, der Krankheitsverlauf, die Entwicklung des Blutbildes und der Organveränderungen verhielten sich in allen Versuchen genau wie bei Kontrolltieren. Desgleichen sahen wir auch in der zweiten Generation der mit vorbestrahltem Virus infizierten Tiere keine Änderung. Röntgenbestrahlungen bis zu enormen Dosen üben also auf das Agens der Erythroleukose *in vitro* keine Wirkung aus.

Die Lebensdauer unserer Tiere schwankte allerdings in ziemlich breiten Grenzen. Bei den Kontrolltieren betrug sie 8—20, durchschnittlich.

11 Tage, bei den Versuchstieren 7 bis zu 16, im Mittelwert 10 Tage. In beiden Gruppen blieben die Schwankungen in den gleichen Grenzen. Da also Schwankungen von 7 bis zu 20 oder mehr Tagen auch bei dem sehr virulenten und zu einem sehr einheitlichen Krankheitsbilde führenden Stamm, wie dem von Jármai, normalerweise vorkommen können, so darf wohl die Beobachtung von Engelbreth-Holm und Rothe-Meyer, einer Verlängerung der Lebensdauer eines Huhnes bis auf 14 Tage nach der Bestrahlung, als eine Schwankung im normalen Rahmen und nicht als Röntgenwirkung aufgefaßt werden.

In der Gruppe unserer mit 40 HED vorbestrahltem Virus infizierten Tiere zeigten zwei Tiere keine Zeichen der Erkrankung. Sie blieben auch nach einer erneuten Infektion mit unbestrahltem Infektionsstoff einen Monat später resistent. Auch in der Reihe der Kontrolltiere stießen wir jedoch auf zwei Tiere, bei welchen die erste Infektion nicht anging; bei einer zweiten, einen Monat später vorgenommenen Infektion erkrankte allerdings das eine Tier. Es dürfte sich also vielleicht bei diesem Tier das erstemal um einen Injektionsfehler gehandelt haben. Natürlich-resistente Tiere sind also gar nicht so selten, man muß mit großen Reihen arbeiten, um einem Fehler bei Beurteilung der Strahlungserfolge, welcher sich aus diesem Umstand ergeben könnte, ausweichen zu können. Wir sind der Ansicht, daß die vereinzelte Beobachtung von Jármai sowie von Engelbreth-Holm und Rothe-Meyer über Verlust der Pathogenität des Virus nach Bestrahlungen in vivo ihre Erklärung vielleicht darin finden dürfte, daß es sich auch hier zufälligerweise um natürlich-resistente Tiere, nicht aber um eine Röntgenwirkung gehandelt hat.

Es besteht nun die Frage, ob die Tatsache der überaus großen Resistenz Röntgenstrahlen gegenüber etwas dazu beitragen kann, die Frage nach der Natur des Erregers zu beantworten. In welche Gruppe von krankheitserregenden Stoffen muß ein Agens gehören, welches so große Strahlenmengen ohne nachweisbare Schädigung verträgt?

Nach Crank und Furth sowie nach Rothe-Meyer und Engelbreth-Holm kämen bei der experimentellen Übertragung der Leukose zwei Möglichkeiten in Betracht: 1. Das in den Kreislauf eines gesunden Tieres gebrachte Agens reizt die Zellen des rezeptiven hämatopoetischen Gewebes zur Wucherung und verleiht ihnen gleichzeitig auch die Fähigkeit zu neuer Agensproduktion. 2. Die agenshaltigen leukotischen Zellen rufen die Leukose im Wirtstier durch autonomes Wachstum hervor. Letztere Ansicht ist auch bisher schon durch die verschiedensten Beobachtungen widerlegt, kann nun aber auch von röntgentherapeutischer Seite als überaus unwahrscheinlich erwiesen werden, denn Körperzellen,

welche eine Strahlendosis von 200 HED ohne Schaden und ohne Einbuße an Proliferationsfähigkeit vertragen, gibt es wohl nicht. Die Hühnerleukose ist also keinesfalls ein einfacher Impftumor, der sich durch im Wirtstier autonom weiterwachsende Zellen übertragen läßt. Das Virus ist nicht notwendigerweise an lebende Zellen gebunden.

Auch das Agens des Rous-Sarkoms ist nicht an lebendes Zellmaterial gebunden, verträgt die Eintrocknung bis zu 7 Monaten und geht durch die Berkefeld-Filter, ist also nach heutiger Auffassung ein Ultravirus, wie es bis vor kurzem die Auffassung auch über das Leukoseagens war. Auch in Anbetracht der Röntgenresistenz läßt sich zwischen beiden Agensarten gut eine Parallele ziehen, denn Lacassagne, Leyaditi und Galloway berichteten über Bestrahlungsversuche am Rous-Sarkom, deren Ergebnisse viel Ähnlichkeit mit unseren Beobachtungen am Leukoseagens aufweisen. Diese Autoren konnten durch lokale Bestrahlung des Tumors dessen Schwund mit verhältnismäßig kleinen Dosen leicht erreichen, ohne aber selbst durch Dosen von 100, 150, ja 250 H den Infektionsstoff vernichten zu können. Der primäre Impftumor verschwand, die Tiere gingen jedoch an Metastasen zugrunde, und bei Übertragungsversuchen erwiesen sich Tumorteile auch nach so großen Strahleneinwirkungen als voll infektiösfähig. In vitro bewahrte das Tumorgewebe und auch dessen Filtrat seine volle Pathogenität selbst nach einer Dosis von 600 H. Die Ansicht von Engelbreth-Holm und Rothe-Meyer, daß sich das Leukoseagens Röntgenstrahlen gegenüber ähnlich dem Rous-Agens verhält, besteht also zu Recht.

Jármay, Engelbreth-Holm, Rothe-Meyer und andere neuzeitliche Leukoseforscher vertreten auf Grund der bisher erforschten biologischen Eigenschaften des übertragbaren Leukoseagens die Ansicht, daß das Agens überhaupt kein Virus im eigentlichen Sinne des Wortes, also kein selbständiges, zu selbständiger Vermehrung fähiges Lebewesen, die Leukose der Hühner also keine Infektionskrankheit, sondern eher ein „flüssiger Tumor“ sei, welcher durch ein Produkt der Leukosezellen hervorgerufen werde, welches die spezifisch-rezeptiven Knochenmarkszellen enzymartig zur Wucherung reize und ihnen gleichzeitig auch die Fähigkeit verleihe, den fermentartig wirkenden Reizstoff selbst wieder zu bilden. Es sprechen für diese Ansicht vor allem immunbiologische Eigenschaften der Krankheit. Die überaus große Röntgenresistenz des Infektionsstoffes ist mit dieser Auffassung gut in Einklang zu bringen, denn auf selbständige, vermehrungsfähige Lebewesen dürften enorme Röntgendosen denn doch nicht ganz ohne Wirkung bleiben. Die Wirkung der Röntgenstrahlen auf Mikroorganismen ist zwar im allgemeinen keine große, aber dennoch auch nach bedeutend kleineren Dosen nachzuweisen (vgl. Klövekorn, Klövekorn und Gärtner,

Pauli und Sulger usw.). Um über die mikroorganismen-tötende Wirkung der Röntgenstrahlen selbst ein Urteil bilden zu können, untersuchten wir die Einwirkung der von uns verwendeten Strahlendosen auf eine 24 Stunden alte Kultur frischer virulenter Typhusbazillen. Es wurde eine 24 Stunden alte dichtbewachsene Schrägagarplatte mit 8 cm³ physiologischer Kochsalzlösung abgespült, und die Bakterienemulsion unter genau denselben Bestrahlungsbedingungen bei Zimmertemperatur in einer kleinen Glasschale der Wirkung von 10, 20, 40, 80, 100, 120, 150 und 200 HED ausgesetzt. Nach Erreichung der jeweiligen Dosis entnahmen wir je eine Platinöse voll Infektionsstoff auf Schrägagarplatten und setzten die Platten 24 Stunden lang in den Brutschrank. Das Ergebnis war folgendes: Die Strahlendosen bis 100 HED übten keine bemerkbare Wirkung aus, die Agarkulturen wuchsen genau so üppig wie die unbestrahlten Kontrollen. Die Platte, welche mit 120 HED bestrahlten Bakterien besetzt wurde, zeigte deutlich ein spärlicheres Wachstum; nach 150 HED zählten wir nur 10—15 angegangene Kolonien auf der Platte und nach 200 HED nur 6. Wenn also die Dosis von 200 HED auch nicht alle Typhusbakterien getötet hat, so waren nach dieser Strahlenmenge doch nur noch wenige lebende und vermehrungsfähige Keime nachzuweisen. Falls also der Erreger der Leukose irgendein zu der Gruppe der Mikroorganismen gehöriges Lebewesen wäre, hätte unserer Ansicht nach doch wenigstens eine deutliche Minderung der Infektionskraft oder der Inkubationszeit nachgewiesen werden müssen. Es scheinen also auch die Ergebnisse unserer Bestrahlungsversuche dafür zu sprechen, daß der Infektionsstoff der übertragbaren Hühnerleukose aller Wahrscheinlichkeit nach kein lebendes Virus ist.

Auf die Frage, ob das Agens tatsächlich ein fermentartiges Produkt der Leukosezellen sei, läßt sich auf Grund von Röntgenresistenzversuchen natürlich nicht einmal vermutungsweise antworten. Bei der sehr großen Resistenz des Agens ist aber jedenfalls zu bedenken, daß sich die meisten Autoren darin einig sind, daß Röntgenstrahlen auf Fermente ohne wesentlichen Einfluß sind (Wells, Nagai, Hallheimer und Schinz, Schneider, Zeller u. a., vgl. auch C. Oppenheimer, Die Fermente...). Wells konnte auch nachweisen, daß Eiweißkörper in Adsorptionsbindung an der Blutkatalase Röntgenstrahlen gegenüber eine starke Schutzwirkung ausüben. Aus den Filtrationsversuchen von Jármai aber geht klar hervor, daß das Leukoseagens an Eiweißkörper gebunden ist, denn in eiweißfreien Filtraten ist das Virus nicht mehr nachzuweisen. Zwischen der Enzymtheorie von Jármai bezüglich des Erregers der übertragbaren Hühnerleukämie und dem Verhalten desselben Agens Röntgeneinwirkungen gegenüber besteht somit allem Anschein nach eine gute Übereinstimmung.

Zusammenfassung.

Es wurden in vitro Bestrahlungsversuche zur Bestimmung der Röntgenresistenz des Virus der übertragbaren Hühnererythroleukose (Ellermann) unternommen. Das Virus (Stamm von Jármai) erwies sich Röntgenstrahlendosen bis zu 200 HED gegenüber vollkommen resistent, die Infektionskraft und Virulenz des Agens konnte nicht geschwächt werden. Diese Ergebnisse scheinen die Vermutung zu bestätigen, daß das Agens der Hühnerleukose und das Virus des Rous-Sarkoms sich Röntgenstrahlen gegenüber ähnlich verhalten, scheinen aber auch die Meinung von Jármai stützen zu können, daß das Agens der übertragbaren Hühnerleukose allem Anschein nach kein Lebewesen, sondern ein lebloses Produkt der Leukosezellen sei.

Schrifttum.

Ausführliche Zusammenstellung des Schrifttums über Hühnerleukämie.

Hallheimer und Schinz, Strahlenther. **20**, 331. — K. Jármai, Die Leukosen der Haustiere. Erg. allg. Path. u. path. Anatomie der Menschen und Tiere **28**, 227 (1934). — Klövekorn, Strahlenther. **20**, 354. — Klövekorn und Gärtner, ebd. **23**, 148. — Lacassagne, Levaditi und Galloway, C. r. Soc. Biol. Paris **97**, 336 (1927). — Nagai, Strahlenther. **18**, 212. — Pauli und Sulger, ebd. **32**, 761 (1929). — Schneider, ebd. **20**, 793. — Sulger, ebd. **36**, 546. — Wells, ebd. **16**, 319 (1924). — Zeller, ebd. **23**, 336 (1926).

Vergleiche auch C. Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen. Leipzig 1925.